

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21620071152005

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

海洋真菌抗肿瘤活性筛选及其次级代谢产
物的初步研究

The Screening of Antitumor Activity of Marine Fungi
and Study on the Secondary Metabolites of Marine Fungi

徐宇航

指导教师姓名: 郑忠辉 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2010 年 月

论文答辩时间: 2010 年 月

学位授予日期: 2010 年 月

答辩委员会主席: 沈月毛 教授

评 阅 人: _____

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在 年解密后适用本授权书。
2. 不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一部分 前言	1
1 海洋真菌的研究概况	1
1.1 海绵来源海洋真菌	2
1.2 红树林来源海洋真菌	3
1.3 极端环境海洋真菌	4
2 海洋真菌次级代谢产物的研究概况	5
2.1 抗肿瘤活性化合物	5
2.2 抗菌活性化合物	8
2.3 其他活性化合物	9
3 本课题研究的目的、意义及主要内容	11
第二部分 材料与方法	12
1 材 料	12
1.1 样品及来源	12
1.2 肿瘤细胞株	12
1.3 拮抗测定指示菌	12
1.4 常用试剂	12
1.5 常用培养基	13
1.6 主要试剂及耗材	13
1.7 主要仪器	14
2 方 法	15
2.1 菌株鉴定	15
2.2 菌株发酵	16
2.3 天然产物的分离纯化	17

2.4 化合物的结构鉴定	18
2.5 抗肿瘤活性测定	19
2.6 抗菌活性测定	19
第三部分 结果与分析	20
1 海洋真菌抗肿瘤活性菌株的初筛	20
2 海洋真菌抗肿瘤活性菌株的复筛	22
3 海洋真菌抗肿瘤活性菌株的种属分布	23
4 菌株 HSGb-12 的鉴定及其次级代谢产物的研究	23
4.1 菌株 HSGb-12 的鉴定	23
4.2 菌株发酵和培养物的处理	25
4.3 发酵产物的分离纯化	25
4.4 化合物的结构解析	27
4.5 化合物活性检测	35
5 菌株 Ty02b-5 的鉴定及其次级代谢产物的研究	36
5.1 菌株 Ty02b-5 的鉴定	36
5.2 菌株发酵和培养物的处理	37
5.3 发酵产物的分离纯化	37
5.4 化合物结构解析	40
5.5 化合物活性检测	48
6 菌株 HQGb-3f 的鉴定及其次级代谢产物的研究	49
6.1 菌株 HQGb-3f 的鉴定	49
6.2 菌株发酵和培养物的处理	50
6.3 发酵产物的分离纯化	50
6.4 化合物结构解析	52
6.5 化合物活性检测	54
7 菌株 ZL02a-7 的鉴定及其次级代谢产物的研究	54
7.1 菌株 ZL02a-7 的鉴定	55
7.2 菌株发酵和培养物的处理	56
7.3 发酵产物的分离纯化	56

7.4 化合物结构解析	58
7.5 化合物活性检测	61
第四部分 讨论与结论	62
1 海洋真菌抗肿瘤活性筛选	62
2 葡萄座腔菌属海洋真菌 HSGb-12 和 HQGb-3f 次级代谢产物的研究	63
3 结论与展望	66
参考文献	68
致 谢	76
附 录	77
1 本论文分离鉴定的化合物	77
2 新化合物 ^1H -NMR 谱图	78

CONTENTS

Abstract	I
Abstract in English	II
Part 1 Introduction	1
1 Advance on marine fungi	1
1.1 Marine fungi from sponges	2
1.2 Marine fungi from mangroves	4
1.3 Marine fungi from extreme environments	4
2 Advance on natural products of marine fungi	5
2.1 Antitumor metabolites	5
2.2 Antimicrobial metabolites	8
2.3 Other activities metabolites	9
3 Purpose, contents and significane of this thesis	11
Part 2 Materials and Methods	12
1 Materials	12
1.1 Sample and Source	12
1.2 The tumor cells	12
1.3 The indicator organism	12
1.4 Reagent	12
1.5 Media	13
1.6 Main reagents and disposable materials	13
1.7 Main instruments	14
2 Methods	15
2.1 Identification of strain	15
2.2 Fermentation of strain	16
2.3 Isolation and purification of natural products	17
2.4 Structure elucidation	18

2.5 The antitumor activity	19
2.6 The antimicrobial activity.....	19
Part 3 Results and analysis	20
1 Primary screening of antitumor activity of marine fungi.....	20
2 Secondary screening of antitumor activity of marine fungi	22
3 Genera of marine fungi with antitumor activities	23
4 The identification of strain HSGb-12 and its metabolites study	23
4.1 The identification of strain HSGb-12.....	23
4.2 Cultivation and extraction of strain HSGb-12	25
4.3 The isolation of metabolites.....	25
4.4 The structure of compounds	27
4.5 Testing of activities of compounds	35
5 The identification of strain Ty02b-5 and its metabolites study	36
5.1 The identification of strain Ty02b-5	36
5.2 Cultivation and extraction of strain Ty02b-5	37
5.3 The isolation of metabolites.....	37
5.4 The structure of compounds	40
5.5 Testing of activities of compounds	48
6 The identification of strain HQGb-3f and its metabolites study	49
6.1 The identification of strain HQGb-3f.....	49
6.2 Cultivation and extraction of strain HQGb-3f.....	50
6.3 The isolation of metabolites.....	50
6.4 The structure of compounds	52
6.5 Testing of activities of compounds	54
7 The identification of strain ZL02a-7 and its metabolites study	54
7.1 The identification of strain ZL02a-7	55
7.2 Cultivation and extraction of strain ZL02a-7	56
7.3 The isolation of metabolites.....	56
7.4 The structure of compounds	58

7.5 Testing of activities of compounds	61
Part 4 Discussion and Conclusion.....	62
1 Screening of antitumor activity of marine fungi.....	62
2 The studies of metabolites from <i>Botryosphaeria</i> sp. HSGb-12, HQGb-3f	63
3 Conclusion and Expectation	66
References	68
Acknowledgements	76
Appendix	77
1 Secondary metabolites isolated during this study	77
2 ¹ H-NMR spectra of new compounds.....	78

摘要

海洋真菌是海洋微生物的重要类群。这类真菌种类多,分布广。近年来各项研究表明海洋真菌是开发新药潜在的宝贵资源。海洋真菌代谢产物生物活性研究中,抗肿瘤活性是其中的一个重要方面。近十几年来,已从不同的海洋真菌中分离到许多新型的抗肿瘤次级代谢产物,其中已有一些活性高、毒性低的次级代谢产物或其结构改造化合物成为抗肿瘤新药候选先导化合物,显现出诱人的前景。

本文从 231 株厦门海域海洋真菌中筛选抗肿瘤活性物质产生菌,旨在发掘具有潜在应用前景的抗肿瘤活性菌株,并对其中的 4 株海洋真菌的次级代谢产物进行初步的研究,为开发新抗肿瘤药物奠定基础。

以人宫颈癌 HeLa 细胞、人肝癌 HepG-2 细胞、人胃癌 BGC-823 细胞为指示瘤株,采用 MTT 法对 231 株海洋真菌的抗肿瘤活性进行初筛测定。测定结果显示,有 15 株菌株粗提物对 HeLa 细胞有抑制作用 (抑制率 $\geq 50\%$), 占总供测菌株的 6.4%; 有 8 株对 HepG-2 细胞有抑制作用, 占总供测菌株的 3.4%; 有 13 株对 BGC-823 细胞有抑制作用, 占总供测菌株的 5.6%。

从活性菌株中选择了 10 株对肿瘤细胞具有很强的抑制活性的菌株进一步复筛测定其培养物粗提物对指示瘤株 HeLa 的 IC_{50} , 大部分菌株的 IC_{50} 值在 10 $\mu\text{g/mL}$ 以下, 菌株 JSSa-2、JQGa-6f 和 hzl02a-1 对 HeLa 细胞的 IC_{50} 分别达到了 0.38、0.18、0.29 $\mu\text{g/mL}$, 具有很高的深入研究价值。

根据菌株的形态特征,对具有抗肿瘤活性的菌株进行鉴定和分类。231 株菌主要分布在 9 个属中,以青霉和曲霉为主,分别占活性菌株的 36.0%和 28.0%。

本文对 4 株海洋真菌 HSGb-12 菌株、Ty02b-5 菌株、HQGb-3f 菌株和 ZL02a-7 菌株的次级代谢产物进行了初步研究,共分离得到 23 个化合物,其中 5 个为尚未报道的新化合物,其余 18 个为已知化合物。部分化合物在生物活性测试中表现出较强的抗肿瘤和抗菌活性。

本论文研究表明,海洋来源的真菌中蕴藏着丰富的抗肿瘤抗菌活性物质产生菌,同时也蕴藏着较丰富的结构新颖的代谢产物,是开发微生物药物的重要资源。

关键词: 海洋真菌; 抗肿瘤; 次级代谢产物

Abstract

Marine fungi are important groups of marine organisms, they are variety and widely distributed. In recent years, studies show that marine fungi are promising and valuable resources for discovery of new drugs. Among the biological activities of fungi metabolites, the antitumor activity is one of important aspect of activities. Over the last decade, many new antitumor natural products were isolated from kinds of marine fungi, some of which and their structural modification products showed high antitumor activity and low toxicity *in vitro* tests, revealing their attractive prospects.

In this study, we studied antitumor activity of 231 strains of marine fungi isolated from samples which were collected from seas around Xiamen, identify strains with promising antitumor activity. The secondary metabolites of four marine fungi strains were studied, laid the foundation for the development of new antitumor drugs.

10.8% of marine fungi fermentation broths displayed antitumor activity on HeLa or HepG-2 or BGC-823 at the concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$. 15 strains of marine fungi displayed antitumor activity on HeLa, with 8 on HepG-2 and 13 on BGC-823, some displayed antitumor activity on more than two tumor cells.

The IC_{50} of 10 strains of active fungi were tested on HeLa, such as JSSa-2, JQGa-6f and hzl02a-1, the values of IC_{50} were determined to be 0.38, 0.18 and 0.29 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

The active marine fungi were identified as 9 genera, most of which belong to *Penicillium* sp. or *Aspergillus* sp.

In the studies of the secondary metabolites of four marine fungi strains HSGb-12, Ty02b-5, HQGb-3f and ZL02a-7, 23 compounds including 5 new compounds were isolated. In the tests of antitumor and antimicrobial activities, several compounds showed strong activities.

Our study indicated that marine fungi included numbers of potent fungi with antitumor activity, they also bears abundant metabolites of novel structures, might become a promising source for antitumor bioactive agents.

Key words: marine fungi; antitumor activity; metabolites

第一部分 前言

1 海洋真菌的研究概况

海洋是生命的起源地，海洋环境的多样性和特殊性如高盐、高压、低温、低营养或无光照等特殊生态环境，共同造就了海洋微生物种类的多样性和特殊性^[1-5]。在占地球面积 70% 的海洋中，人类已知的微生物仅占总数的 10%^[6]。海洋微生物是海洋里最庞大的生物类群，与海洋动植物比较具有以下优点：在海洋中的分布范围更广，物种多样性更加丰富；次生代谢产物类型更加多样，既可产生与海洋动植物相似或是相同的代谢产物，又可合成结构独特的化合物^[7-8]；并且可以利用现代微生物发酵技术进行生产，具有不破坏海洋生态资源、无原材料后顾之忧、易实现产业化等优点。因此，海洋微生物被认为是极具开发前景的生物资源。

海洋真菌是海洋微生物的重要组成部分，可分为专性海洋真菌和兼性海洋真菌。专性海洋真菌是指那些只能在海洋或河口地区生长和产孢的真菌，兼性海洋真菌是指那些既能在海洋环境中生长，也能在淡水或陆地环境中生长的真菌^[9]。人类对海洋真菌的研究要追溯到 1869 年，法国人迪尔约等从海草中首先发现海洋真菌。目前，已有包括担子菌、子囊菌、丝分孢子菌和海洋酵母等约 800 种专性海洋真菌被报道^[10]。

海洋真菌的生物地理分布主要取决于温度和海水盐度。由于对海洋真菌的研究不多，有关海洋真菌在全球海洋生态系统中地理分布的研究甚少。Shearer^[11]等人总结了已发现海洋真菌的地理分布（见表 1.1）。从表 1.1 数据来看，已知的大部分海洋真菌是在热带与温带海域中发现的，这可能也与目前海洋真菌研究主要集中在这些区域有关。

海洋真菌广泛分布于近海及深海中，海水、海洋沉积物、海洋漂木及海洋动植物的体表或组织内部等都有它们的存在，它们组成了海洋生态系统中的重要一环。从生态学角度上来说，它们是食物链和能量流的重要组成部分，在营养物质循环中起到了关键作用^[12]。一些海洋真菌是海洋动植物的致病菌，或者和其它微生物一起与海洋动植物形成共附生体系^[13]。

表 1.1 各地区海洋丝状真菌种数

Tab 1.1 Number of species of filamentous marine fungi from different geographical areas

Region ^{a,b}	Known	Undescribed
Arctic	28	1
Antarctic	4	
WH Boreal	1	
WH N. Temperate	164	83
WH Tropics	99	
WH S. Temperate	60	
EH Boreal	28	
EH European Temperate	139	
EH Asian Temperate	47	
EH Northern Africa	25	
EH Tropical Africa	25	
EH Indian Ocean Island	81	58
EH Temperate Africa	55	31
EH Middle East	22	18
EH Tropical Asia	182	164
EH Austral Asia	114	78
EH Pacific Islands	70	5

a WH: Western Hemisphere b EH: Eastern Hemisphere

资料来源: Shearer C A, Descals E, *et al.* Fungal biodiversity in aquatic habitats[J]. Biodivers Conserv, 2007, 16: 49-67.

1.1 海绵来源海洋真菌

海绵是一类已有 7-8 亿年进化历史的多细胞无脊椎动物, 它们广泛分布在潮间带至几千米的深海中^[14]。因其自身形态构造特点, 海绵是许多微生物的天然宿主, 微生物在海绵体内占到了 50-60% 的生物量^[15]。有研究显示海绵共附生海洋真菌包含了最多的海洋真菌种类, 是海洋真菌的第一大来源^[16]。这些微生物为海绵提供营养和保护, 与海绵形成共生互生体系^[17]。在长期进化过程中, 海绵产生了化学防御机制来保护自身, 抵抗竞争者、捕食者和入侵微生物, 海绵体内的次级代谢产物正是扮演了这样一个关键角色^[18]。这些次级代谢产物, 大多由海绵共附生微生物产生, 类型包括了多肽、聚酮、大环内酯、生物碱、甾醇和萜类等,

具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒等一系列活性^[19]。在已经进入临床研究的13个海洋天然产物中，有12个来自无脊椎动物及其共附生微生物，其中，海绵所属的多孔动物门及其共附生微生物又占了大多数^[20-21]。

Menezes^[22]等人从巴西圣保罗北海岸的 3 种不同的海绵中共分离得到 193 株海洋真菌，包含了 19 个以上的属（见图 1.1），大部分属于子囊菌门，也有一些属于担子菌门和接合菌门。其中，青霉、曲霉和镰刀霉又占据了绝大部分，这也和其他大多数类似研究结果相似^[23]。

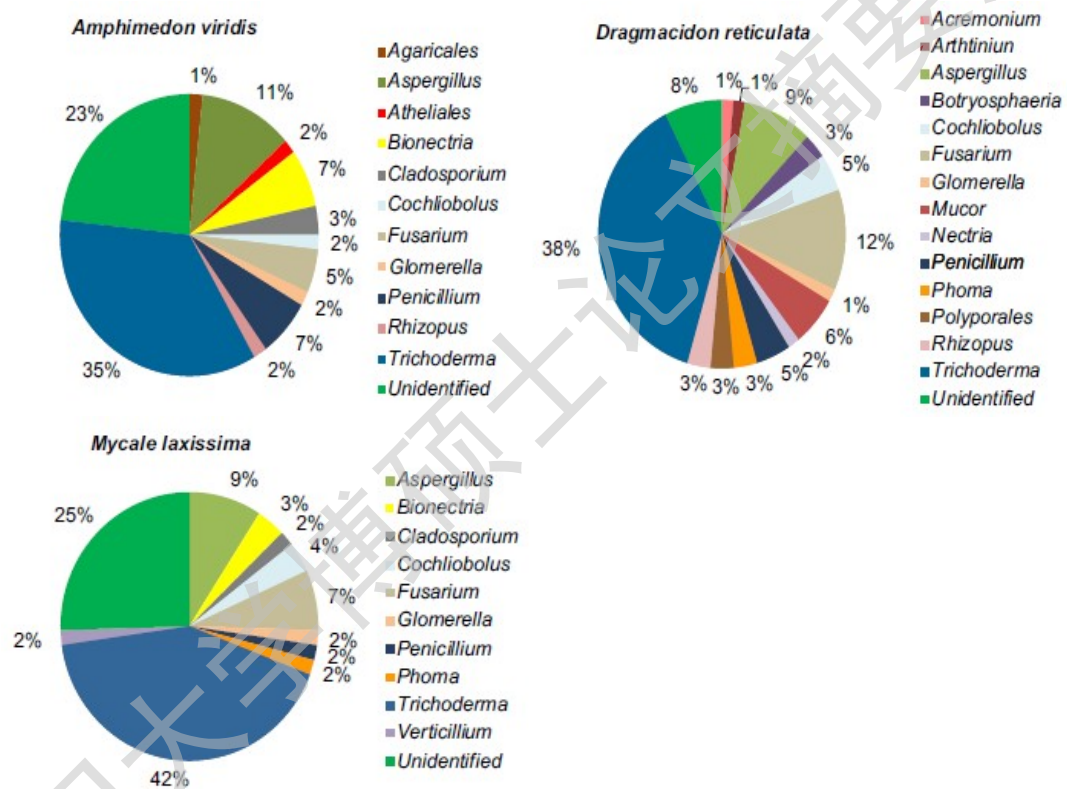


图 1.1 海绵来源的海洋真菌的种属分布

Fig 1.1 Occurrence of filamentous fungi in marine sponge samples

值得一提的是，在以前的研究中，担子菌很少从海洋中分离得到，而 Menezes 等人却首次从 2 种海绵样品中分离得到这类海洋真菌。

1.2 红树林来源海洋真菌

红树林是自然分布于热带、亚热带潮间带或河口边缘，受周期性潮水浸淹，以红树植物为主体的常绿灌木或乔木组成的潮滩湿地木本植物群落。这些生长于海滨淤泥滩涂上的红树植物，处于海洋、陆地和大气的动态交界面，周期性遭受

海水浸淹的潮间带环境^[24]。由于潮间带生境特殊：高度盐渍化、通气不良、高光辐射及周期性的海水浸淹，经长期的自然选择和进化适应，红树植物逐渐形成了一套独特的形态及生理生化适应特征：根系发达且多样，以“胎生”方式进行繁殖，次生木质部结构特殊，通气组织特别发达等^[25]。

红树林来源海洋真菌数目庞大，种类繁多，构成了海洋真菌的第二大来源^[26]。Schmit 和 Shear^[27]总结了 280 种红树林来源的海洋真菌，其中包括了 198 种子囊菌、78 种丝分孢子菌和 4 种担子菌。

红树林来源真菌在红树林这一特殊生态系统中起着举足轻重的作用。一方面，它们作为分解者，利用纤维素酶降解红树植物的枯萎枝叶；另一方面，它们侵入红树植物表皮的破损处，是一些红树植物的病原菌；还有一些红树林内生真菌，在植物体内与红树植物形成共附生体系，在形态，遗传，生态方面影响着宿主植物^[28]。

1.3 极端环境海洋真菌

海洋中有许多生境并不适应普通生物生长繁殖，如晒盐场、酸性和碱性的泉、海底火山口以及深海高压缺氧低温环境等。而能适应这些严酷生境，在此生长繁殖的特殊微生物，则被称为极端微生物或嗜极微生物 (Extremophile)。

晒盐场是人们为了从海水中获取食盐，而构建形成的人工超盐环境。海水蒸发到盐类结晶的过程，使得盐池系统中盐浓度有了较大跨度的变化 (盐浓度从海水盐浓度直至 30%以上)，形成了一种独特的盐田生态系统。由于晒盐场盐浓度变化跨度大，成为人们研究极端嗜盐菌的理想生境。从世界各个的盐场中分离到的真菌主要有：嗜盐的 *Hortaea werneckii*、*Phaeotheca triangularis* 和 *Trimmatostroma salium* 等，以及耐盐的 *Aureobasidium* 属、*Cladosporium* 属、曲霉属和青霉属的一些不同种^[29-31]。

Burgaud G^[32]等人系统研究了海底火山口来源的海洋真菌，基于小亚基 rDNA (SSU rDNA) 全序列的分子系统学分析显示，海底火山口来源的海洋真菌尽管数量稀少但却显示出新的序列，突出了该环境下海洋真菌的独特性。

2 海洋真菌次级代谢产物的研究概况

由于条件限制,国内外对海洋真菌研究起步较迟,对其代谢产物化学及生物活性的研究水平远不及海洋细菌和放线菌。近十几年来,国内外非常重视海洋真菌次级代谢产物的研究,并已取得重大进展。各项研究表明海洋真菌是开发新药潜在的宝贵资源^[33-36]。1994 年以前从海洋真菌中发现的新化合物还不到 35 个,而现在从海洋真菌中分离得到的新化合物已经超过 272 个,并且数目还在继续增长^[37-39]。

海洋真菌次级代谢产物不仅结构多样,包括萜类、甾醇、大环内酯、酮类、肽类、生物碱、醚类及杂环化合物等类型,而且生物活性非常广泛,除了抗菌、抗肿瘤活性外,还有抗病毒、抗氧化、酶抑制剂等活性,显示出良好的应用前景。

2.1 抗肿瘤活性化合物

海洋真菌代谢产物生物活性研究中,抗肿瘤活性是其中的一个重要方面。近十几年来,已从不同的海洋真菌中分离到许多新型的抗肿瘤次级代谢产物,其中已有一些活性高、毒性低的次级代谢产物或其结构改造化合物成为抗肿瘤新药候选先导化合物,显现出诱人的前景。

Monodictyochrome A和B (1, 2), 是从海藻真菌*Monodictys putredinis*中分离得到的2个新的氧杂蒽酮类衍生物^[40]。

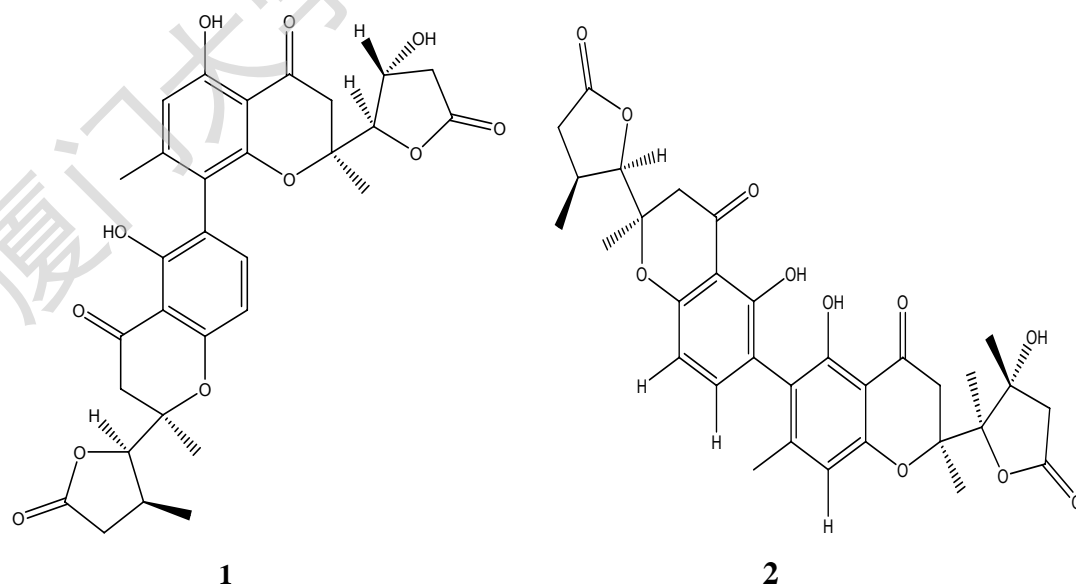


图 1.2 化合物 1-2 的化学结构

Fig 1.2 The chemical structures of 1-2

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库